



KONGERIKET NORGE
The Kingdom of Norway

Bekreftelse på patentsøknad nr
Certification of patent application no

1999 6330

Det bekreftes herved at vedheftede dokument er nøyaktig utskrift/kopi av ovennevnte søknad, som opprinnelig inngitt 1998.12.23

It is hereby certified that the annexed document is a true copy of the above-mentioned application, as originally filed on 1998.12.23

2003.07.17

Freddy Strømme

Freddy Strømme
Seksjonsleder

Line Reum

Line Reum



PATENTSTYRET®
Styret for det industrielle rettsvern

16

20 DES. 1999

PATENTSTYRET

20.DES99 996330

E10507

EK/KBN

17.12.1999

UTSKILT FRA SØKNAD nr. 19986133 av 23/12-1998

Preben Lexow
Fløensbakken 41A
5009 Bergen

Oppfinner:

Søkeren

Metoder for sekvensanalyse

Foreliggende oppfinnelse er utskilt fra patentsøknad 19986133 som omfatter en metode for DNA-sekvensering som inneholder følgende trinn:

5 Første trinn tar utgangspunkt i en ren DNA-populasjon bestående av DNA-sekvensen som skal sekvenseres. DNA-molekylene kuttet/brekkes på en uspesifikk måte slik at det dannes en populasjon med DNA-molekyler bestående av biter (heretter kalt DNA-biter) av den opprinnelige sekvensen.

10 Annet trinn består i å erstatte baseparene i DNA-bitene med 4 ulike DNA-sekvenser (heretter kalt DNA-fragmenter) som representerer hver av de fire basene adenin, cytosin, guanin og tymin. Der hvor det har vært basepar A-T, settes det altså inn "fragment A", C-G byttes ut med "fragment C" osv. Dermed genereres nye DNA-molekyler hvor den opprinnelige baserekkefølgen på f.eks. ACGTT... erstattes med fragment A - fragment C - fragment G osv. Lengden på disse fire DNA-fragmentene kan i prinsippet
15 variere i lengde fra 2bp til flere hundre kbp (eller mer om ønskelig), alt etter behov. Tilsvarende kan DNA-fragmentene inneholde reportergener og annen biologisk informasjon eller kun bestå av sekvenser uten kjent biologisk funksjon.

20 I tredje trinn avleses rekkefølgen av de fire typene DNA-fragmenter for hvert enkelt DNA-molekyl. Dermed finner man baserekkefølgen i de opprinnelige DNA-bitene indirekte.

I fjerde trinn benytter et dataprogram overlappen mellom DNA-bitene til å sette sammen informasjonen fra trinn 3 til sekvensen på DNA-sekvensene som ble brukt som utgangspunkt.
25

Foreliggende oppfinnelse omhandler bl.a. alternative måter for utførelsen av trinn tre 2 + 3; avlesning av de fire typene DNA-fragmenter for indirekte å finne baserekkefølgen.

Alternativ 1

For å finne en bedre metode til å lokalisere fluorescerende DNA-prober brukte Weier og medarbeidere en teknikk kalt «molecular combing»; En løsning med mål-DNA som probene ble hybridisert til ble plassert på en flat glassoverflate preparert slik at DNA-molekylene festet seg med en av endene til glassplaten. Deretter fikk de DNA-molekylene til å rette seg ut ved hjelp av en væskestrøm. Ved hjelp av et fluorescens mikroskop kunne de dermed observere probenes relative posisjoner på de utstrakte DNA-molekylene.

Ved å bruke fire prober merket med ulike fluoroforer og som hybridiserer til de fire DNA-fragmentene som representerer «A», «C», «G» og «T» vil den ovenstående teknikken kunne brukes til å avlese sekvensrekkefølgen direkte med et fluorescensmikroskop. Ved å utvikle programvare som gjør at mikroskopet «scanner» glassplaten samtidig som sekvensrekkefølgene analyseres automatisk, evt bruke et scanning cytometer, vil det sannsynligvis bli mulig å avlese flere tusen basepar per minutt.

Metoden blir ekstra effektiv hvis DNA-molekylene arrangeres regelmessig slik at mengden sekvensinformasjon blir ekstra stor per «bilde». En måte å gjøre det på er å merke DNA-molekylene med biotin for deretter å feste dem til en plate med et regelmessig streptavidinmønster (fig. 1) I stedet for å bruke en væskestrøm til å rette ut DNA-molekylene kan man bruke en positiv ladning som trekker de negativt ladede DNA-molekylene i en retning. Effektiviteten i avlesningen vil sannsynligvis øke med en faktor på 10-100 ved hjelp av denne strategien.

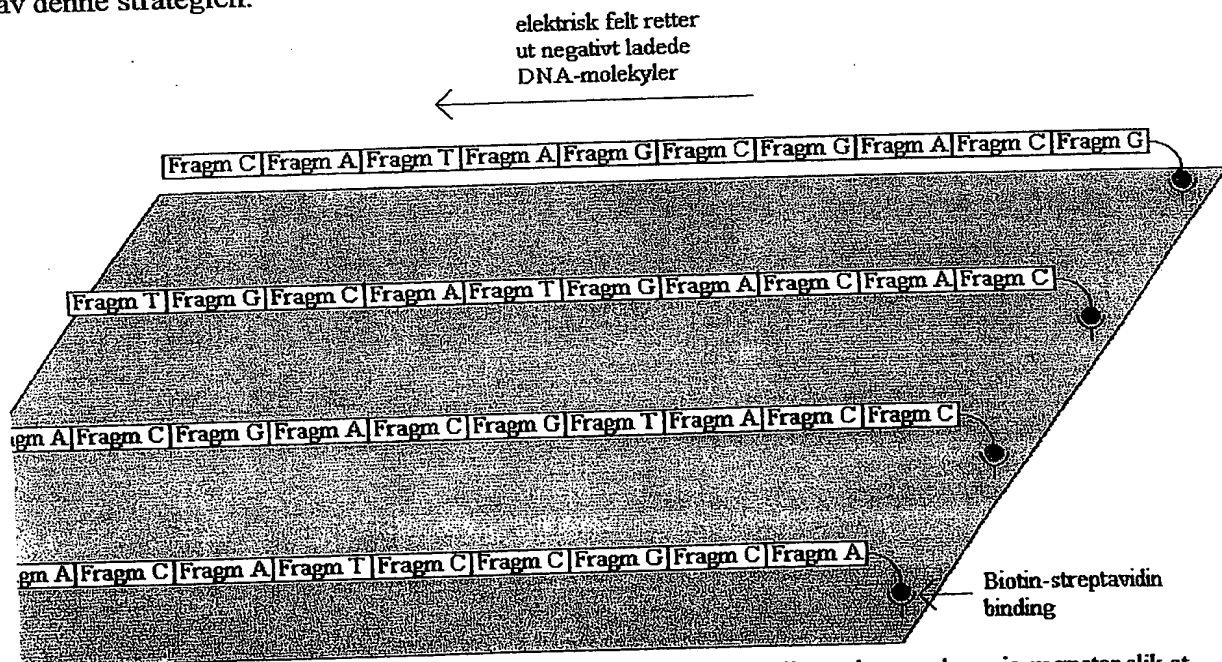


Fig.1. Figuren illustrerer et utsnitt av en plate hvor DNA-molekylene ligger i et regelmessig mønster slik at effektiviteten ved avlesningen øker.

Alternativ 2

Potensialet for hurtig avlesning vil sannsynligvis være enda større hvis man anvender et flowcytometer for å avlese de fluorescerende probene. En forutsetning for dette er at DNA-molekylene passerer avlesningsenheten på et flowcytometer i utstrukt form slik at DNA-fragmentene som representerer «A», «C», «G» og «T» vil passere i rekkefølge.

En metode for å få DNA-molekylene utstrukt er å blande dem med streptavidindekte magnetkuler, små glasskuler (binder DNA-molekyler naturlig) eller lignende, i stort overskudd slik at de binder DNA-molekylene i forholdet 1:1. DNA-molekylene vil ha mindre motstand enn kulene i en væskestrøm slik at de tenderer til å bevege seg bort fra hverandre helt til DNA-molekylet er utstrukt. Hvis væskestrømmen er kraftig eller kulene store slik at forskjellen i motstand for DNA-molekylene og kulene er stor vil DNA-molekylet kunne ryke. Dette problemet vil imidlertid kunne unngås ved å senke flow-hastigheten eller bruke mindre kuler.

En alternativ strategi er å bruke et elektrisk eller magnetisk felt i stedet for væskestrøm til å trekke partiklene forbi fluorescensdetektoren. Det kan gjøres ved å utnytte at glasskulene har positiv ladning mens DNA-molekyler er negativt ladd, eller bruke superparamagnetiske kuler istedenfor glass. Dermed vil kulene trekke DNA-molekylene som henger etter som rette tråder.

En kritisk parameter ved denne strategien er flowcytometrenes nedre deteksjonsgrenser for fluorescens. Flere grupper har klart å detektere enkelte fluorofor-molekyler ved å senke flow-hastigheten. Ønsker man imidlertid å bruke konvensjonelle flow-cytometre med analysehastigheter på 20-30.000 partikler per sekund må man bruke lengre prober slik at det kan festes mange fluoroferer til hver probe.

De raskeste flowcytometrene per i dag har kapasitet til å analysere ca. 200.000 fluorescerende partikler per sekund. Disse flowcytometrene er imidlertid ikke kommersielt tilgjengelige. I tillegg kommer at det er usikkert hvor høye flow-hastigheter DNA-molekyler tåler i utstrukt form før de ryker. Det er imidlertid realistisk å anta at DNA-molekylene vil tåle hastigheter som gjør det mulig å avlese et sted mellom 5-50 tusen basepar per sekund (med en hastighet på 50.000 bp/s vil ett flowcytometer kunne avlese 3 billioner bp (tilsvarer det humane genom) på i underkant av 17 timer. Sammenlignet med HUGO-prosjektet hvor man regner med å bruke 17 år og betydelige laboratorieressurser i over 20 land på å få sekvensert det første humane genom vil dette representere en betydelig nyvinning.)

Alternativ 3:

Utgangspunktet for dette alternativet er det samme som for alternativ 1 hvor DNA-molekylene festes på en regelmessig måte til en streptavidindekt plate. Men i motsetning til alternativ 1 avleses fragmentsammenstningen ved at det er lagt små elektriske kretser inn i platen som blir brutt eller aktivert av reportermolekyler festet til fragmentene. Man kan enten tenke seg fire ulike reportermolekyler for hver av basene A, C, G og T, evt at man bruker det samme reportermolekylet posisjonert på fire ulike steder på fragmentene. Med multiplexere, parallelle computerinnganger og annen moderne elektronikk er det mulig å registrere et sted mellom 1-10 millioner signaler i sekundet. Med slike hastigheter vil man i beste fall kunne avlese et humant genom på 5-10 min og til en meget lav kostnad.

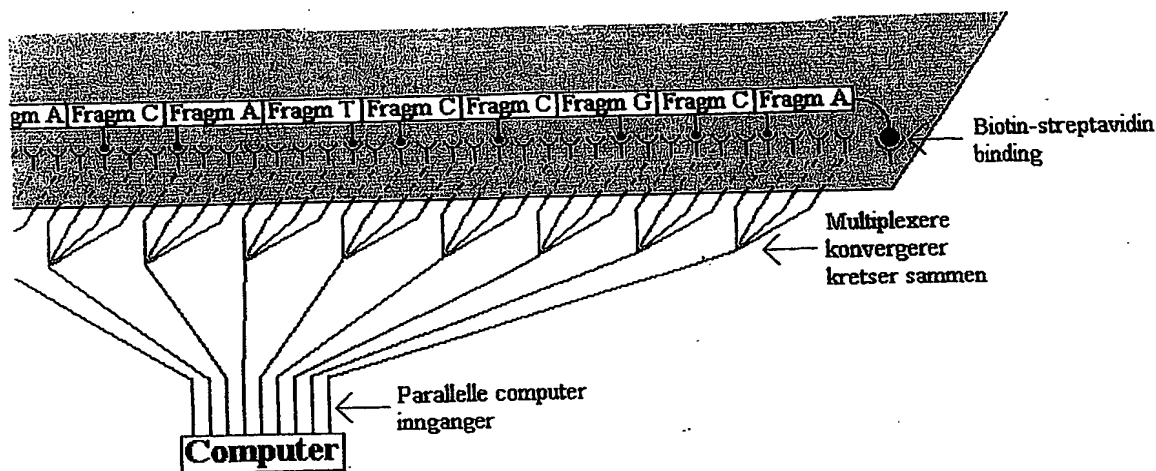


Fig. 3a. Figuren viser reportermolekyler som er festet på fragmentene og som bryter eller oppretter elektriske kretser ved å binde seg til sensorer på platen. Legg merke til at reportermolekylenes relative posisjoner varierer slik at fragmentA bryter/oppretter kretsA, fragmentC bryter/oppretter kretsC, osv. Figuren viser videre hvordan man ved å bruke multiplexere, parallele computerinnganger, mm kan avlese flere kretser parallellt. Det må presiseres at figuren er sterkt forenklet..

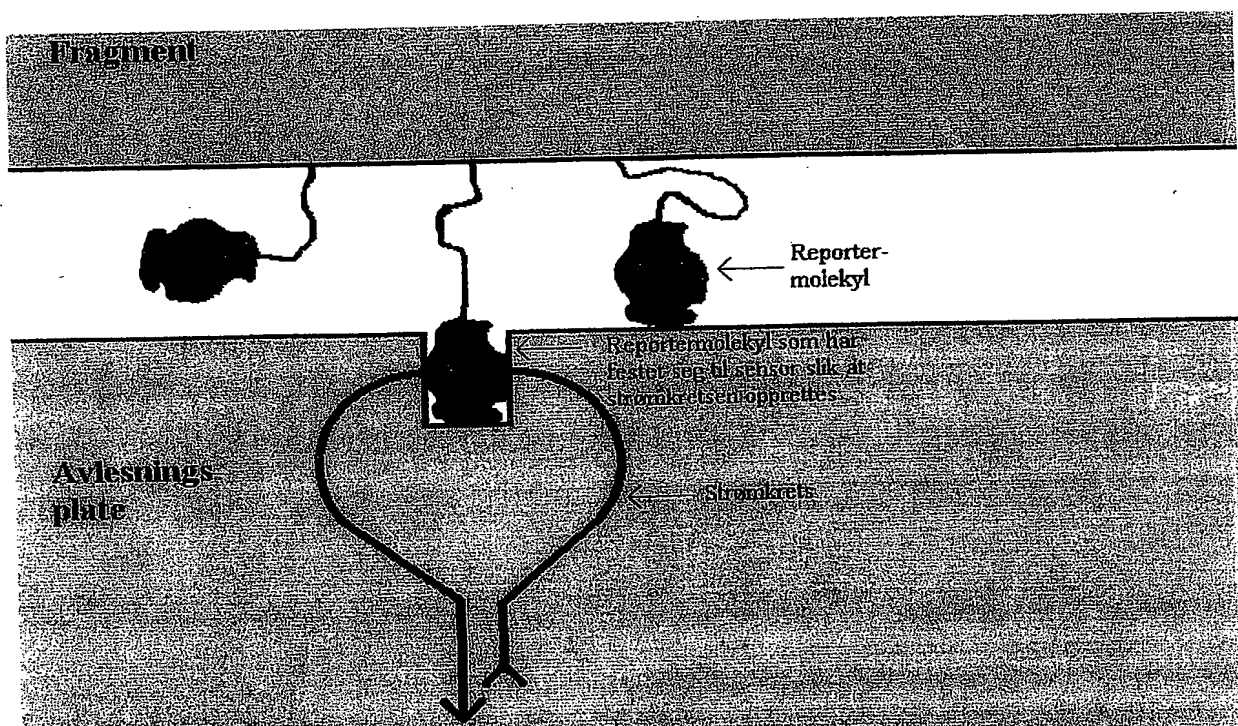


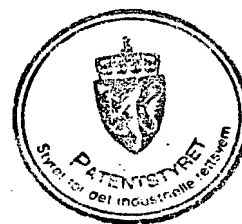
Fig 3b. Eksempel på kobling mellom reportermolekyler og strømkrets. I eksempelet er det brukt reportermolekyler med strømledende egenskaper slik at det kretsen opprettes hvis et reportermolekyl binder seg til sensoren. For å øke sjansen for en vellykket binding er det festet flere reportermolekyler i samme posisjon på fragmentet.

Fig 3b viser en av mange strategier for å koble reportermolekyler med strømkretsene i avlesningsplaten. En annen strategi er å bruke reportermolekyler som danner sterke bindinger med «moduler» på avlesningsplaten. Disse modulene er formet slik at de kan rives løs fra avlesningsplaten hvis DNA-molekylene blir revet bort. Når modulene løsner bryter de en strømkrets slik at det blir registrert hvilke moduler i avlesningsplaten som er fjernet.

Et viktig poeng med alternativ 3 er at den potensielt også vil kunne anvendes uten å måtte forstørre DNA-molekylene som skal sekvenseres. I stedet for å forstørre DNA-molekylene kan man inkorporere ulike vedheng på basene som sensorene kan registrere. Det må videre poengteres at ovennevnte fremstilling er sterkt forenklet. Det finnes en rekke strategier som gjør at presisjonen for alternativ 3 kan økes.

Andre alternativer:

En rekke andre strategier kan tenkes for å avlese rekkefølgen på DNA-fragmentene i de ulike DNA-bitene. I tillegg kommer at idéen om å konvertere et DNA-molekyl til DNA-fragmenter innsatt i samme rekkefølge som de opprinnelige baseparene vil kunne løse en del av de problemene som har oppstått i forbindelse med andre DNA-sekvenseringsprosjekter.



P a t e n t k r a v

1.

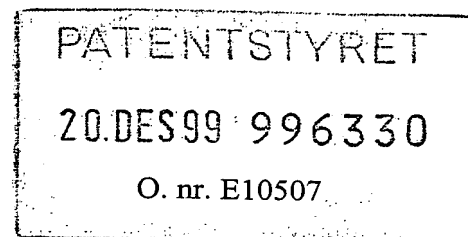
Fremgangsmåte ved sekvensanalyse, k a r a k t e r i s e r t v e d
s beskrivelsen.



1e

Sammendrag

20 DES. 1999



Metoder for avlesning ved sekvensanalyse.

